PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07036 G01N 33/68 A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Februar 1998 (19.02.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/04396

(22) Internationales Anmeldedatum: 13. August 1997 (13.08.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 32 521.8 197 25 362.8 13. August 1996 (13.08.96) DE

16. Juni 1997 (16.06.97) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). SCHRADER, Michael [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). OPITZ, Hans-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: Al., AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

- (54) Title: PROCESS FOR DETERMINING THE STATUS OF AN ORGANISM BY PEPTIDE MEASUREMENT
- (54) Bezelchnung: VERFAHREN ZUR ERFASSUNG DES STATUS EINES ORGANISMUS DURCH MESSUNG VON PEPTIDEN
- (57) Abstract

A process is disclosed for determining the status of an organism by measuring peptides in a sample of the organism which contains high-molecular and low-molecular peptides and acts as an indicator of the organism status. Low-molecular peptides are directly sensed and characterised, and are then correlated with a reference.

### (57) Zusammenfassung

Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hochund niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Alberico	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowesien
AM	Armenies	FI	Finaland	LT	Litauen	SK	Slowakci
ΑT	Österreich	FR	Prankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabus	LY	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	CB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tsched
BA	Bosnica-Herzegowina	G₽	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikisten
BE	Belgien	GN	Gainea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Thrkei
BG	Bulgarien	HU .	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	triand	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belares	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	ıπ	kalien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP.	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CC	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Victam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawica
a	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
СМ	Kamerun		Korea	PL	Polca	••••	Zimo <b>z</b> owc
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Ruminien		·
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	u	Licchtenstein	SD	Swdan		
DK	Dinemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/07036 PCT/EP97/04396

# <u>Verfahren zur Erfassung des Status eines</u> <u>Organismus durch Messung von Peptiden</u>

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus.

Zur Erfassung des Status eines Organismus werden verschiedene analytische Methoden eingesetzt. So wird beispielsweise in der Diagnostik von höheren Organismen bei pathologischen Befunden aufgrund der Symptomatik versucht, die Ursache der pathologischen Veränderung zu ergründen, um eine kausale Therapie zu entwickeln. Desweiteren ist man bemüht, durch Sequenzierung der Genome von Organismen und Etablierung von "Wildtyp-Genomen" eine Referenz eines durchschnittlichen, "gesunden" Organismus zu entwickeln, um dann individuelle Abweichungen, die auf mögliche pathogene Entwicklungen hinweisen können, durch entsprechende Genanalysen zu entdecken. Nachteilig an dem ersten methodischen Ansatz ist, daß man keine hypothesenfreie Diagnostik durchführen kann, da dabei eine Diagnose unternommen wird, die bereits auf Vermutungen beruht. Nachteilig an dem zweiten Verfahren ist, daß es auf lange Sicht noch nicht möglich sein wird, wichtige

oder gar alle auf genetische Fehlfunktionen zurückzuführende Erkrankungen zu diagnostizieren. Ein weiterer Nachteil der zuletzt genannten Methode kann auch darin bestehen, daß eine Mutation auf einem Gen nicht unbedingt zur Expression des damit verbundenen Phänotypen führt.

Es ware mithin wünschenswert, über ein universell einsetzbares diagnostisches Verfahren zu verfügen, mit welchem es
gelingt, die geschilderten Nachteile zu vermeiden und insbesondere eine hypothesenfreie Diagnostik durchführen zu
können. Das diagnostische Verfahren sollte darüber hinaus
universell einsetzbar sein, nicht beschränkt bleiben auf
höher entwickelte Systeme, sondern auch gleichfalls einsetzbar sein, um den Status von niederen Organismen zu erfassen.
Es sollte darüber hinaus leicht etablierbar sein und mit an
sich bekannten Techniken ausgeführt werden können.

Ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem liegt mithin in der Bereitstellung eines solchen Verfahrens.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem in einfacher Weise durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus geht davon aus, daß dem zu untersuchenden Organismus eine Probe entnommen wird. Die Probe kann auch der vollständige Organismus sein. Die Probe muß niedrigmolekulare Peptide enthalten, wobei es nicht stört, wenn die Probe neben niedrigmolekularen Peptiden auch hochmolekulare Peptide oder Proteine enthält. Die niedrigmolekularen Peptide werden dabei erfindungsgemäß direkt erfaßt und charakterisiert und dienen als Indikator für den Status des Organismus. Dabei ist es sowohl möglich, einzelne Peptide direkt meßtechnisch zu erfassen, mehrere Peptide meßtechnisch zu

WO 98/07036 PCT/EP97/04396

- 3 -

erfassen bis hin zu allen in der Probe befindlichen und meßtechnisch erfaßbaren niedermolekularen Peptide. Anders als bei herkömmlichen analytischen oder diagnostischen Methoden, wie die Gel-Elektrophorese oder die zweidimensionale Elektrophorese und beispielsweise klinische diagnostische Methoden, werden hier nicht die hochmolekularen Strukturen, wie beispielsweise Proteine untersucht. Im Gegensatz zu an sich bekannten diagnostischen Methoden, wie beispielsweise Radioimmunassay oder anderen Kompetitionsassays zur Messung von Peptidhormonen und ähnlichem, werden erfindungsgemäß die niedermolekularen Peptide direkt meßtechnisch erfaßt und nicht wie in den genannten Methoden indirekt. Als Referenz dient die Verteilung niedrigmolekularer Peptide bei einem repräsentativen Querschnitt von definierten Kontrollen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die zu untersuchende Probe von Geweben- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus, dessen Status aufgenommen werden soll, stammen oder es kann der Organismus selbst oder Teile davon sein. Im Falle der Untersuchung niederer Organismen dient vorzugsweise der Organismus selbst als Probe. Als niedere Organismen kommen insbesondere Einzeller, wie prokaryontische Systeme oder einfache eukaryontische Systeme, wie Hefen oder andere Mikroorganismen, in Betracht.

Erfindungsgemäß sollen die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 30.000 Dalton aufweisen. Die untere Grenze ist an sich nicht kritisch, jedoch stellen Dipeptide die untere Grenze der niedrigmolekularen Peptide, die erfindungsgemäß erfaßt werden sollen, dar. Insbesondere bevorzugt sind Molekulargewichte der niedrigmolekularen Peptide von 100 bis 10.000 Dalton.

Falls erforderlich, weil beispielsweise durch eine veränderte Meßanordnung bedingt, kann es vorteilhaft sein, hochmolekulare Peptide oder Proteine sowie andere Biopolymere, die möglicherweise mit der Messung interferieren, aus der Probe zu entfernen. Dies ist insbesondere dann nicht erforderlich, wenn durch die erfindungsgemäß einzusetzende Meßmethode die höhermolekularen Peptidverbindungen meßtechnisch nicht erfaßt werden.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß die Massenspektroskopie zur Erfassung der niedermolekularen Peptide eingesetzt. Insbesondere bewährt hat sich dabei die sogenannte MALDI-Methode (Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie). Wird die Massenspektrometrie als Methode eingesetzt, empfiehlt es sich, die durch die Massenspektroskopie ermittelbaren Daten zur Charakterisierung der niedermolekularen Peptide einzusetzen, wie beispielsweise deren Molekulargewicht. Es ist ebenfalls möglich, unter bestimmten Umständen andere Parameter zu analysieren, wie beispielsweise die Ladung der Peptide oder die charakteristische Retentionszeit auf Chromatographiesäulen oder ein Fragmentmuster der niedermolekularen Peptide oder Kombinationen aus Masse der niedrigmolekularen Peptide und deren Ladungen.

Je nach Fragestellung, die mit der Erfassung des Status des Organismus noch verbunden ist, kann es vorteilhaft sein, die Probe auf mehrere Fraktionen zu verteilen und die Proben unter verschiedenen Fragestellungen oder meßtechnischen Anordnungen zu analysieren und somit einen Status des Organismus zu erfassen.

Als Organismen dienen insbesondere Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen von Tieren und Menschen. So wird es erfindungsgemäß ermöglicht, den Status von genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen zu untersuchen. Dies kann insbesondere bei Überprüfungen von transformierten Systemen vorteilhaft sein, um zu erkennen, inwie-

weit transformierte Organismen möglicherweise unerwartete oder unerwünschte Eigenschaften entwickelt haben, indem beispielsweise Peptide gebildet werden, die auf unerwünschte oder unerwartete Eigenschaften, wie toxische Eigenschaften, hinweisen.

Insbesondere kann jede bewußt oder unbewußt vorgenommene Manipulation (Konditionierung) eines Organismus dessen Status beeinflussen, sei es im Rahmen der Verabreichung von Medikamenten, der Gentherapie, bei Infektionen, am Arbeitsplatz durch Kontakt mit chemischen Stoffen, bei Versuchstieren, insbesondere transgenen Tieren und knock-out-Mutanten. Insbesondere bei solchen Verfahren kann durch den intra- und inter-individuellen Vergleich, beispielsweise durch chronologische Probenentnahme aus einem Organismus vor und im Verlauf einer der oben genannten Maßnahmen oder durch Vergleich mit nicht behandelten Kontrollorganismen, überprüft werden, ob die vorhergesagten, erwünschten Änderungen im Status tatsächlich eingetreten sind und ob darüberhinaus oder stattdessen nicht vorhergesagte, unerwünschte oder auch erwünschte Änderungen eingetreten sind, die durch das erfindungsgemäße Verfahren hypothesenfrei erfaßt werden.

Daher eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zum Beispiel zur Begleitung von klinischen Studien, toxikologischen Untersuchungen bei der Erprobung von Medikamenten aller Art, zur Analyse/Erfassung von Abbauprodukten, zur Identifikation von Genprodukten.

In der Veterinär- und Humanmedizin entwickelt das erfindungsgemäße Verfahren seine überragende Bedeutung dadurch, daß eine hypothesenfreie Erfassung des Status des betreffenden Organismus ermöglicht wird. Es wird also nicht bereits mit einer vorgefaßten Meinung ein Bestätigungsassay durchgeführt, sondern es wird ein echtes Gesamtbild des Status des untersuchten Organismus erstellbar. Das erfindungsgemäße Verfahren, daß als differentielles Peptiddisplay (Differential

Peptide Display) bezeichnet werden kann, geht dabei davon aus, daß in einem gesunden Organismus ein bestimmtes Peptidmuster vorhanden ist und deshalb in der Lage ist, als Referenzstandard zu dienen. Nimmt man nun den Peptidstatus eines Individuums auf und vergleicht diesen mit der Referenz, so kann man einerseits Abweichungen feststellen, die bereits einen ersten Hinweis auf einen möglicherweise pathogenen Zustand geben. Werden nunmehr die Abweichungen, die durch Vergleich mit ähnlichen pathogenen Zuständen erstellt worden sind, aus entsprechenden Proben eines Erkrankten ermittelt, so kann bereits durch Vergleich der Abweichungen im Peptidmuster der Probe des Individuums und Übereinstimmung der Abweichung mit einem zugeordneten Krankheitsbild die betreffende Erkrankung direkt aus der Analyse identifiziert werden.

Erfindungsgemäß kann dabei insbesondere wie folgt vorgegangen werden. Zur Herstellung einer Referenzprobe können zunächst Ultrafiltrate aus Körperflüssigkeiten und Gewebsextrakten verwendet werden. Die Gewinnung der Filtratpeptide und ihre Auftrennung in Fraktionen erfolgt, indem beispielsweise niedrigmolekulare Peptidfraktionen gewonnen werden. Die Charakterisierung der Peptidfraktionen kann beispielsweise anhand von Retentionsverhalten und molekularer Masse, ermittelbar durch Chromatographie oder Massenspektroskopie, erfolgen. Wird beispielsweise Ultrafiltrat von Patienten, die an einer bekannten Erkrankung leiden, verwendet und dieses mit dem zuvor erstellten Spektrum von gesunden Referenzprobanden verglichen, kann durch das abweichende Muster eine Zuordnung der spezifischen Erkrankung mit dem Status des betreffenden Peptidgemisches erfolgen. Die Methode kann somit auch in an sich herkömmlicher Weise eingesetzt werden, indem beispielsweise gleich das entsprechende auf pathogene Veränderungen hinweisende Peptidmuster abgefragt wird. Im Einzelfall kann dies sogar ein für die entsprechende Krankheit charakteristisches Peptid sein. Analysiert man z. B. eine Probe aus einem Patienten, bei dem ein bestimmtes

- 7 .

Erkrankungsbild erkennbar ist und eine Hypothese für die Ursache dieser Erkrankung besteht, kann beispielsweise dieses spezifische Peptid in der Analyse gemäß Erfindung ebenfalls abgefragt werden und bei positivem Ausgang entsprechende Therapiepläne eingerichtet werden. So ist es durchaus möglich, zunächst dem Patienten eine Probe zu entnehmen, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einen Status aufzunehmen, um dann bei Feststellen des Vorliegens einer auf pathogene Zustände hinweisenden Abweichung entweder durch an sich bekannte Bestätigungsassays, unter Heranziehung der üblichen klinischen Assays, eine Kontrollmessung durchzuführen oder die Kontrollmessung durch spezifisches Screening nach dem Indikator des pathogenen Zustands durchzuführen.

Peptide können dabei nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise Ultrafiltration des entsprechenden Ausgangsmaterials, gewonnen werden. Dabei werden Filter mit einer molekularen Ausschlußgröße verwendet, die in dem erfindungsgemäß beanspruchten Bereich liegen, also zwischen denen eines Dipeptides und maximal 30.000 Dalton. Durch geeignete Wahl der jeweiligen Membranen können auch bestimmte Molekulargewichtsfraktionen gewonnen werden. Vorzugsweise werden im Rahmen der Filtration 0,2 ml bis 50 l Filtrat gewonnen, das beispielsweise sofort nach Abschluß der Filtration durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 bis 4 eingestellt wird. Die genannten Mengen dienen insbesondere dazu, gepoolte Proben zu untersuchen, zum einen zur Entwicklung von Referenzproben gesunder Probanden bzw. zur Bestimmung krankheitsspezifischer Peptidmarker zur Erstellung einer Peptiddatenbank.

Die nach Ultrafiltration im Filtrat vorliegenden Peptide werden durch Adsorption an chromatographische Materialien, insbesondere Kationenaustauscher, wie beispielsweise Fractogel, Anionenaustauscher-Fractogel TMAE und Reverse-Phase-(RP)-Materialien, mit nachfolgender Elution durch lineare Gradienten oder Stufengradienten gewonnen. Zur weiteren

Aufreinigung können gegebenenfalls weitere chromatographische Trennungen, insbesondere über RP-Phasenmaterial durchgeführt werden.

Die Erfassung der Peptidfraktionen erfolgt vorzugsweise durch massenspektrometrische Analyse, insbesondere mit der MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry) oder ESI-MS (electro spray ionisation-MS). Dies sind Methoden, die zur Analyse von Peptiden einsetzbar sind. Hierbei wird vorzugsweise mit einer On-Line-Kopplung einer Microbore RP-Trennung und der Massenspektrometrie (LC-MS-Kopplung) gearbeitet. Aus den erhaltenen Daten wird eine mehrdimensionale Tabelle nach Retentionsverhalten, Molekulargewicht und Signalintensität als bevorzugte Leitparameter erstellt. Es können jedoch auch andere mit den genannten Methoden ermittelbare Größen erfaßt werden.

Die über die vorgenannten Schritte gewonnenen Daten über Patienten mit einer bekannten Grunderkrankung werden mit den gleichartig gewonnenen Daten einer gesunden Referenzpopulation verglichen. Hierbei werden sowohl qualitative Änderungen (z.B. das Auftreten neuer Peptide oder das Fehlen von Peptiden), als auch quantitative Änderungen (das vermehrte beziehungsweise verminderte Auftreten von einzelnen Peptiden) festgestellt. Die über die vergleichende Analyse definierten Targets können, falls erforderlich, im weiteren durch den Fachmann bekannte Methoden peptidchemisch gereinigt und identifiziert werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen können dann mit Protein- und Nucleinsäuredatenbanken sowie nachfolgend mit Literaturdaten verglichen werden. Relevanz der dargestellten Peptide bezüglich der untersuchten Erkrankung wird überprüft durch funktionelle Studien und durch Reihenscreening an geeigneten Patientengruppen.

WO 98/07036 PCT/EP97/04396

- 9 -

### Beispiel 1

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Blutfiltrat (Hāmo-filtrat, HF)

### 1. Gewinnung von HF

HF wird im Rahmen einer arterio-venösen oder auch venovenösen Hämofiltration nach dem Fachmann bekannten Techniken an ausgewählten Patienten oder Probanden durchgeführt. Die Gewinnung von HF erfolgt in der Weise, wie sie im Prinzip bei chronisch nierenkranken Patienten routinemäßig durchqeführt wird. Über eine arterielle Ableitung und venöse Zuleitung (arterio-venöse HF) oder eine venöse Ableitung mit venöser Zuleitung (veno-venöse HF) wird das Blut des Patienten unter apparativer Unterstützung durch ein Hämofiltratsgerät (z. B. Hemoprozessor, Sartorius, Göttingen; AK 10 HFM, Gambro, Hechingen) über ein Hämofilter geleitet (z. B. Hemoflow F 60 oder Hemoflow HF 80 S, Fresenius, Bad Homburg; Hemoflow FH 77 H und Hemoflow HF 88 H, Gambro), das eine molekulare Ausschlußgröße von bis zu 30 kDa besitzt. Das dem Patienten entzogene Filtratvolumen wird durch eine Elektrolytlösung substituiert (z. B. SH 01, SH 05, SH 22, SH29, Schiwa, Glandorf).

Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens wird eine diagnostische Hämofiltration mit dem Ziel durchgeführt, zwischen 1 und 30 l HF bei einem Patienten innerhalb einer Hämofiltration zu gewinnen. Das Hämofiltrat wird zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 4 eingestellt und auf 4°C gekühlt.

- 2. Gewinnung der HF-Peptide und Auftrennung in Fraktionen
- 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Hāmofiltrat werden mit entionisiertem Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit Salzsäure auf 2,7 eingestellt. Das HF wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der HF-Peptide werden die gebundenen Peptide mit einer pH-Stufenelution eluiert. Dabei werden 7 Puffer mit aufsteigendem pH verwendet.

### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214, 280 nm

Saule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm

Füllhöhe

Säulenmaterial: Fraktogel TSK SP 650 M (Merck, Darmstadt) Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Molarität
Elutionspuffer 1	3,6	Zitronensäure	0,1
Elutionspuffer 2	4,5	Essigsäure	0,1
Elutionspuffer 3	5,0	Apfelsäure	0,1
Elutionspuffer 4	5,6	Bernsteinsäure	0,1
Elutionspuffer 5	6,6	Natriumdihydrogenphosphat	0,1
Elutionspuffer 6	7,4	Dinatriumhydrogenphosphat	0,1
Elutionspuffer 7	9,0	Ammoniumcarbonat	0,1

Die Eluate 1 - 7 werden separat gesammelt.

### 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Eluate 1 - 7 werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäure, 1 cm Durchmesser, 12,5 Füllhöhe Säulenmaterial: Source RPC 15 μm (Pharmacia, Freiburg) Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Das Eluat wird in 4 ml-Fraktionen gesammelt.

### 3. Kartierung der Peptid-Fraktionen

### 3.1

Aliquots der in 2.2 gewonnen Fraktionen werden auf einer Microbore-Reverse-Phase-Säule aufgetragen und im Gradient eluiert. Die Detektion erfolgt mit UV-Detektor und on-line mit einem Elektrospray-Massenspektrometer.

Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftragen: 20  $\mu$ l/min Fluß beim Eluieren: 20  $\mu$ l/min

Detektion: 220 nm

Säule: Cl8 AQS, 3  $\mu\text{m}$ , 120 A, 1 mm Durchmesser, 10 cm Länge

(YMC, Schermbeck)

Anlage: ABI 140 B Dual solvent Delivery System

Puffer A: 0,06% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 90 min

On-Line-Massenspektrometrie:

API III mit Elektrospray-Interface (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Positive Ion Modus

Meßbereich: m/z von 300 bis 2.390

Scan-Zeit: 7 sec

Scan-Fenster: 0,25 m/z

Datenerfassung erfolgt mit MacSpec oder MultiView Software (Perkin-Elmer).

## 3.2 MALDI-MS Messung der einzelnen Fraktionen

Aliquots der in 2.2 gewonnen Fraktionen werden mit unterschiedlichen Matrixsubstanzen, z.B. unter Zusatz von L(-) Fucose im MALDI-MS gemessen.

Aus den Rohdaten wird eine mehrdimensionale Tabelle erstellt unter Berücksichtigung der Scan-Nummer, Signalintensität und nach Kalkulation der Massen aus den multipel geladenen Ionen eines Scans.

## 4. Vergleichende Analyse

4.1 Identifikation neuer, fehlender oder in ihrer Menge deutlich verschiedener Peptide

Durch Vergleich der unter 3.3 erhaltenen Datensätze, die auch als Peptidkarten bezeichnet werden können, werden qualitative und/oder quantitative Unterschiede festgestellt. Dabei werden unter Berücksichtigung von Kontrollen und Proben einzelne Datensätze oder auch Gruppen von Datensätzen zum Vergleich herangezogen.

# 4.2 Peptidchemische Charakterisierung der identifizierten Targets

PCT/EP97/04396

Aus dem gewonnen Rohmaterial (z. B. Großpräparationen von Hämofiltrat) werden die identifizierten Targets in Mengen aufgereinigt, die eine Identifikation erlauben. Dazu werden die unterschiedlichen, dem Fachmann bekannten chromatographischen Trenntechniken (Reverse Phase, Ionenaustausch, Ausschlußgrößenchromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie etc.), die im allgemeinen zur Auftrennung von Peptidgemischen eingesetzt werden, verwendet. Nach jeder chromatographischen Trennung einer Fraktion werden über ESI-MS, MALDI-MS oder auch LC-MS die Targets erneut in den Fraktionen identifiziert. Dieses Procedere wird unter Variation der chromatographischen Parameter so oft wiederholt, bis ein reines Produkt der gesuchten Spezifikation, d. h. Retentionszeit und molekularer Masse, vorliegt. Darauf folgt die Bestimmung einer Teil- oder Komplett-Aminosäuresequenz oder eines Fragmentmusters. Im Anschluß wird ein Datenbankvergleich durchgeführt an den bekannten Datenbanken (Swiss-Prot und EMBL-Peptid- und Nucleinsäure-Datenbank) mit dem Ziel der Identifikation der Teil- oder Komplettsequenz oder eines Fragmentmusters. Ist kein Datenbankeintrag vorhanden, erfolgt die Aufklärung der Primärstruktur.

### Beispiel 2:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Aszites

### 1. Gewinnung von Aszites

Aszites bildet sich as extravasales Exsudat bei unterschiedlichen Erkrankungen (maligne Tumoren, Leberstörungen etc.). Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens werden zwischen 10 ml und 10 l Aszites durch Punktion gewonnen und danach zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit vrdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 eingestellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

- 2. Gewinnung der Aszites-Peptide und Auftrennung in Fraktionen
- 2.1. Peptidextraktion mit Gradienten-Elution
- 5 l Aszites-Filtrat werden auf pH 2,0 eingestellt und über eine präparative Reverse-Phase-Säule getrennt.

### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag 40 ml/min Fluß beim Eluieren: 40 ml/min

Detektion: 214 nm, 280 nm

Säule: Waters Kartuschensystem, 4,7 cm Durchmesser, 30 cm

Füllhöhe

Säulenmaterial: Vydac RP-C18, 15 - 20 μm

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 3,000 ml

Das Eluat wird in 50 ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

### Beispiel 3:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Urin

1. Gewinnung von Urin

Urin wird direkt als Katheterurin oder als Spontanurin von Patienten in Mengen von 0,5 bis 50 l gewonnen und zur Ver-

WO 98/07036

- 15 -

meidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z. B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2,0 und 4,0 eingestellt und auf 4°C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini-Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

- 2. Gewinnung der Urin-Peptide und Auftrennung in Fraktionen
- 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 l Urin-Filtrat werden mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit HCl auf 2,7 eingestellt. Das Urin-Filtrat wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der Peptide werden die gebundenen Peptide mit einem Kochsalzgradienten eluiert.

### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm

Füllhöhe

Säulenmaterial: Merck Fraktogel TSK SP 650 M

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-

Nordenstadt

Puffer A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3,0

Puffer B: 1,5 M NaCl in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 2,000 ml

Das Eluat wird in 10 Pools á 200 ml gesammelt.

# 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Fraktionen werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

### Chromatographiebedingungen:

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäule, 1 cm Durchmesser, 12,5 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Pharmacia Source RPC 15  $\mu m$ 

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsaure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 200 ml

Das Eluat wird in 4ml Fraktionen gesammelt.

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

- 17 -

### Ansprüche

- Verfahren zur Erfassung des Status eines Organismus durch Messung von Peptiden aus einer Probe des Organismus, die hoch- und niedrigmolekulare Peptide enthält, als Indikator für den Status des Organismus, wobei
  - niedrigmolekulare Peptide direkt erfaßt und charakterisiert und
  - mit einer Referenz in Beziehung gesetzt werden.
- Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe Gewebe- oder Flüssigkeitsproben aus dem Organismus oder der Organismus selbst oder Kombinationen davon ist.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von höchstens 30 000 Dalton aufweisen.
- 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, mindestens ein Molekulargewicht, das dem von Dipeptiden entspricht, aufweisen.
- 5. Verfahren nach Anspruch 3 und/oder 4, wobei die niedrigmolekularen Peptide, die zur Messung herangezogen werden, ein Molekulargewicht von 100 bis 10 000 Dalton aufweisen.
- 6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die hochmolekularen Peptide vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide abgetrennt werden oder meßtechnisch oder auswertetechnisch bei der Erfassung der Probe nicht berücksichtigt werden.

- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, 7. wobei die Erfassung der niedrigmolekularen Peptide durch Massenspektrometrie erfolgt.
- 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die niedrigmolekularen Peptide durch die Messung ihres Molekulargewichtes charakterisiert werden.
- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, 9. wobei die Probe vor der Messung der niedrigmolekularen Peptide in verschiedene Fraktionen aufgeteilt wird und unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wird.
- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, 10. wobei als Organismus Prokaryonten, Eukaryonten, vielzellige Organismen, Zellen aus Gewebekulturen, Zellen aus Tieren und Menschen dienen.
- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, 11. wobei die Probe aus genetisch veränderten oder transformierten und/oder konditionierten Organismen stammt.
- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, 12. wobei die Erfassung des Status des Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus, zur Aufdeckung eventueller Abweichungen von einem Referenzzustand, dient.
- Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Erfassung des Status eines transformierten Organismus zur hypothesefreien Untersuchung und Aufnahme des Status des Gesamtorganismus zur Aufdeckung von Veränderungen des transformierten Organismus dient, zur Aufdeckung von mit der Transformation verbundenem Auftreten von Peptiden, die kausal mit Stoffwechselveränderungen zusammenhängen.

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. Inales Aktenzeicher
PCT/EP 97/04396

Name   Continue   Patentidas	A. KLASSI IPK 6	G01N33/68		
B. RECHERCHIERTE GEBRTE  Reconstruction of GOLN  TR 6 GOLN  Recherchians aber nicht zum Mindestprüssiof gehörende Veröffentlichungen, sowielt diese unter die recherchienen Gedelte fallen  Während der insernstönnlich Recherche konsultierte elektrinsische Deserbank (Name der Deserbank und ent. vonwendele Suchbagsfille)  C. ALS WESENTLICH ANGESEHERE UNTERLAGEN  Während der insernstönnlich Recherche konsultierte elektrinsische Deserbank (Name der Deserbank und ent. vonwendele Suchbagsfille)  X. A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal 1,2,10, 12 disease."  JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, 8d. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341–345, XPO02050736  A siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  X. M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide 1,2,10, profile in posoriatic epidermis normalized by treatment with extraiter."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, 8d. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XPO02050737  A siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  X. Weiters veröffentlichungen eind der Forisetzungvon Feld C zu schneiden Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen sind der Forisetzungvon Feld C zu schneiden Federater breiden sind veröffentlichung des packet ein ein oder nach dem krämmstorialen nach ein weiter ein der sich einer si	Alaah dae le	nternettensten Patentidasstikation (IPM) oder nach der nationalen Klas	ssifikation und der IPK	
PRO-Commission   Processor				
Recharchione aber nicht zum Mindeetgrüfsteld gebörende Veröffentschungen, eoweit diese unter die zecherchienen Gediete fallen	Recherchie	arter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo	le )	
Withhead der Intermetionalen Racherche konsulierte alektrimische Datenberk (Name der Datenberk und evd. verwendele Suchbegriffe)  C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTEFLAGEN  Kategorie*  Bezeichrung der Veröffentlichung, soweil erlorderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  Bezeichrung der Veröffentlichung, soweil erlorderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal 1,2,10, 12  JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, 8d. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341–345, XPO2050736  A siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  X M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, 8d. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XPO2050737 siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  **Bezendere Keleporier von angegebenen Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegebenen in der Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegebenen Genard angegeben in der Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegebenen für der Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegeben in der Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegeben in der Veröffenschungen:  **Besendere Keleporier von angegeben in	IPK 6	G01N		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Kategorie*  Bazeichnung der Veröffentlichungs soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal 1,2,10, peptide profile in children with celiac disease."  JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341–345, XP002050736  A siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  X M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XP002050737  A siehe das ganze Dokument 3-9,11, 13  Weilere Veröffentlichungen eind der Fontestzung von Feld C zu orichmen.  ** Veröfentlichung, die ein allgemeinen Stand der Tschmik definient. aber nicht all bestenders bedeitste anschehen har en ein der hierbertanden ein vollen in infamationalen nach dem infamationalen nach dem infamationalen ein infamationalen har en ein der hierbertanden ein Gerinderstung der veröffentlichung die benangen für der eine Prioritätstatung von besonderse Gedeutung die benangen in Erindus von besonderse Gedeutung die benangen in Erindus von Vereinfandischen Prioritätstatung von besonderse Gedeutung die benangen in Erindus von Vereinfandischen Prioritätstatung von besonderse Gedeutung die benangen in Erindus von Besengen (ein benangen in Anstellanden verein besonderse bedeutung die benangen in Erindus von Besengen (ein benangen in der verein ein ausgeführ)  **O Veröffentlichung, die sich aus eine mindlichen Gehebaum, eine Benztzung, eine Aussellung oder andere Nationalen aus eine mindlichen Defendatung eine Veröffentlichung von besondere Bedeutung die benangen in der Veröffentlichung von besondere Bedeutung die benangen in der Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die benangen in der Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die benangen in der Veröffentlichung von besonderer Bedeutung die benangen in der Veröffentlichung von besondere Bedeutung die benangen der Veröffentlichung von besonder	Recherchie	vrte aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete f	allen
A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease." JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341-345, XP002050736   A. Siehe das ganze Dokument	Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	ame der Datenbank und evil. verwendete S	uchbegriffe)
A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointestinal peptide profile in children with celiac disease."  JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341–345, XP002050736  A siehe das ganze Dokument 3–9,11, 13  X M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XP002050737  A siehe das ganze Dokument 3–9,11, 13  X Weldere Veröffentlichungen sind der Fonsetzung von Feld C zu Seiten 124–129, XP002050737  A Siehe das ganze Dokument 3–9,11, 13  -/  X Weldere Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, Bernard und der Gernard	C. ALS WI	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
peptide profile in children with celiac  disease."  JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341–345, XPO02050736  A siehe das ganze Dokument 13  M. J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide 1,2,10, profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XPO02050737  A siehe das ganze Dokument 13  **Beander Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  **Beander Kategorien von angegebenen Stand der Technik definient, abor richt als besonders bedeutsam anzusenten ist  **Bilanes Cokument, das jedoch erst am oder nach dem intermationalen Armelodedatum veröffentlichung, die gelögne ist, einen Prioritäksten veröffentlichung, die gelögne ist, einen Prioritäksten veröffentlichung veröffentlichung der der der bz zugendeführ  **C Veröffentlichung, die gelögne ist, einen Michael veröffentlichung, die beanspruchte Erfindus ausgerührt sien Benatzung, eine Ausstellung oder andere Machacharnen bezehrt veröffentlichung, die veröffentlichung der beanspruchte Erfindus ausgerührt veröffentlichung, die werde mit veräffentlichung der beanspruchte Erfindus ausgerührt veröffentlichung, die Werdersitzber ausgeren ausgesen in Veröffentlichung der beneuer ausgesen veröffentlichung der beneuer ausgesen veröffentlichung der beneuer ausgesen veröffentlichung der beneuer der ausgesen veröffentlichung der beneuer ausgesen der veröffentlichung der beneuer bekannte veröffentlichung der beneuer bekannte veröffentlichung der beneuer beneuer ausgesen der			e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY USA, Seiten 341-345, XP002050736  A siehe das ganze Dokument 3-9,11,  X M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide 1,2,10, profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124-129, XP002050737 Siehe das ganze Dokument 3-9,11,  X Weilers Veröffentlichungen eind der Foritektungvon Feld C zu onnehmen  **Besonders Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :- **Cesanders Kategorien von angegebenen Veröffentlichung, die benacht entst der sich michaelt seiner sich sich sich sich sich sich sich sich	X	peptide profile in children with	inal celiac	
A siehe das ganze Dokument  M. J. STAQUET ET AL.: "Keratin polypeptide profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Seiten 124–129, XP002050737  A siehe das ganze Dokument  *Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  *Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  *A veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, eber richt als besondere bedeutsam anzienen ist mehren her Profitationen eine Armeikodatum veröffentlicht werden ist und mit der Armeikodatum veröffentlicht werden veröffentlichtung deser Veröffentlichung	•	JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTERO Bd. 6, Nr. 3, 1987, NEW YORK NY U		
profile in psoriatic epidermis normalized by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG, Setten 124-129, XP002050737  Siehe das ganze Dokument  "Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A varöffentlichung, die ehn allgemeinen Stand der Technik definient, aber nicht als besondere bedeutsam anzusehen ist  "A immediodatum veröffentlicht worden ist  "Veröffentlichung, die geben ein Veröffentlichungsdatum einer anderen im Rechercherbericht genannten Veröffentlichungsdatum einer anderen im Rechercherbericht die das Veröffentlichungsdatum einer soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  "O' voröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunghein eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunghein Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsunhenn bezieht "Privoröffentlichung, die sich auf eine möndliche Öffenbarung, eine Benutzung, eine Austeilung oder andere Matsung eine Veröffentlichung eine Veröffentlichung eine Benutzung, eine Austeilung der Veröffentlichung einer einer Fachgen in Veröffentlichungen dieser Kelegorie in Veröffentlichungen dieser Kelegorie in Veröffentlichungen dieser Veröffentlichungen dieser Kelegorie in Veröffentlichungen dieser Kelegorie in Ver	A			
Weitere Veröffentlichungen eind der Fortsetzung von Feld C zu  *Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  *A' Veröffertlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzwehen ist  *E ältere Ookument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlichung, die gelogne ist, einen Prioritätsanspruch zweifelnaß erschen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Rachercherberbeicht genanntien Veröffentlichungsdatum einer anderen im Rachercherberbeicht genanntien Veröffentlichung von beanderser Bedeutung; die beanspruchte Erfindung zugrundeliegenden Prioritätischung von beanderser Bedeutung; die beanspruchte Erfindung von beanderser Kalegorie in Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen voröffentlichung von beanderser Kalegorie in Veröffentlichung mit einer Oder mehreren anderen voröffentlichung en dieser Kalegorie in Veröffentlichung die setzt kalegorie in Veröffentlichung mit einer Ausgebaltung dieser Veröffentlichung die dersetben Paterntamite ist.  Datum des Abschlusses der Internationalen Recherchenbenörde  Europäisches Patertamt, P.B. 5818 Patentian 2 NL – 2280 HV Rijswijk T. 1, (431-70) 340-2040, Tx. 31 651 epp nit.	X	profile in psoriatic epidermis no by treatment with etretinate." ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEAR Bd. 275, Nr. 2, 1983, BERLIN FRG,	ormalized RCH,	12
Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen:  * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutsam anzweihen ist nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Anmeldedatum veröffentlicht worden ist nach dem internationalen in Rechercherberberket genannten Veröffentlichtung belogt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Öffenbarung, eine Berutzung, eine Abenstüchung der andere Maßnahmen bezieht P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist veröffentlichung die sein auf eine mündliche Öffenbarung, eine Berutzung, eine Abenstüchung her veröffentlichtung dieser Kategorie in Veröffentlichung dieser Kategorie in Veröffentlichung dieser Kategorie in Veröffentlichung dieser Kategorie in Veröffentlichung dieser Kategorie in Veröffentlichung dieser Kategorie in Veröffentlichun	A			
*Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutetam anzusehen ist  *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutetam anzusehen ist  *A* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichung zeugrundsiegenden Prinzipe oder der ihr zugrundeliegenden Prinzipe auf erfindung zugrundeliegenden Prinzipe auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden veröffentlichung eine Benutzung, die beansp		-	-/	
*A* Veröffertlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist anmeidedatum veröffertlicht worden ist anmeidedatum veröffertlicht worden ist anmeidedatum veröffertlicht worden ist anderen in fachercherbericht worden ist anderen im fachercherbericht genannten Veröffertlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitelhaft erschelnen zu lassen, oder durch die das Veröffertlichung statum einer soll oder die aus einem anderen Neröffertlichung, belegt werden soll oder die aus einem anderen Neröffertlichung statum einer veröffertlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Berutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffertlicht zwerden, wenn die Veröffertlichung mit einer der underen diese Veröffertlichung diese Veröffertlichung diese Veröffertlichung diese Veröffertlichung diese Veröffertlichung mit einer der oder mehreren anderen Veröffertlichung, die Mitglied derseiben Patentlamile ist auf effinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet kerden veröffertlichung, die beanspruchte Erfindung ausgeführt)  "O' Veröffertlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Berutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht verden, wenn die Veröffertlichung mit einer Fachwann naheilagend ist werden, wenn die Veröffertlichung mit einer Fachwann naheilagend ist werden, wenn die Veröffertlichung mit einer Fachwann icht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet verden veröffertlichung diese Veröffertlichung mit einer Pedeutung; die beanspruchte Erfindung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Prinzipa zu erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet verden verden mit auf eine Prinzipa zu erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet verden verden einer Prinzipa zu erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet verden verden eine Prinzipa zu erfinderischer Tätigkeit beruhend verden eine Prinzipa zu erfinderischer Tätigkeit beruhend verden			Siehe Anhang Patentfamilie	
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche  18 . De Zember 1997  Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentarnt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL – 2280 HV Rijewijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  Van Rohemen C	"A" Veröffe aber n "E" älteres Amme "L" Veröffe schelir ander soll oc ausge "O" Veröffe eine E	entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen  Nidedatum verdirentlicht worden ist  Intlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitellaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer  ren im Rachercherbericht genannten Veröffentlichungs belegt werden  der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie  siftlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,  Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  gritichung, die vor dem internationslan Anmeidedatum, aber nach	oder dem Prontätsdatum veröffentschi Ammeldung nicht kolisider, sondem nur Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlic erfinderischer Tätigkeit beruhend betra "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann nicht als auf erfinderischer Tätigke werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für sinen Fachmann	worden ist tim inter our zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden stung; die beanspruchte Erfindung ihung nicht als neu oder auf chiet werden stung; die beanspruchte Erfindung alt beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist
18. Dezember 1997  Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Petentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijewijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 851 epo nt,  Van Rohemen C				
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Van Rohemen C			14/01/1998	
	Name und f	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiean 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 851 epo nl,		-

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. males Aktenzeichen
PCT/EP 97/04396

		EP 97/04396
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffertlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Tei	e Betr. Anspruch Nr.
ategorie*	Bezeichnung der Aeroiteutschung, soweit entitoeisch fürst Angabe det in Beitzen winnenden Leit	e Beat. Attaplication.
	C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, Bd. 94, Nr. 17, 1997, BETHESDA MD USA, Seiten 9481-9486, XP002050738 siehe Seite 9481, Spalte 1, Zeile 1 - Spalte 2, Zeile 19	1-13

2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter anal Application No PCT/EP 97/04396

A. CLASS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68		
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national classific	cation and IPC	····
	S SEARCHED		
IPC 6	ocumentation searched (classification system followed by classificat GO1N	ion symbols)	
	`		
Documente	ation searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the fields sea	urched
Electronic	data base consulted during the international search (name of data br	ase and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rel	evant passages	Relevant to claim No.
			<del></del>
χ	A. HERNANZ ET AL.: "Gastrointes		1,2,10,
	peptide profile in children with disease."	celiac	12
ŕ	JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTER	OLOGY,	•
	vol. 6, no. 3, 1987, NEW YORK NY		
	pages 341-345, XP002050736		3-9,11,
A	see the whole document		13
X	M.J. STAQUET ET AL.: "Keratin p	olypeptide	1,2,10,
	profile in psoriatic epidermis n	ormalized	12
	by treatment with etretinate."  ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEA	RCH	
	vol. 275, no. 2, 1983, BERLIN FR		
_	pages 124-129, XP002050737		2 2 11
A	see the whole document	•	3-9,11, 13
	•	-/	
	<u> </u>		
X Furti	her documents are tisted in the continuation of box C.	Patent family members are listed in	n annex.
* Special ca	degories of cited documents :	"T" later document published after the inter or priority date and not in conflict with	
	ent defining the general state of the art which is not tared to be of particular relevance	cited to understand the principle or the	ory underlying the
"E" earlier o	document but published on or after the international tate	"X" document of particular relevance; the c	isimed invention
"L" docume	ont which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another	involve an inventive step when the do	cument is taken alone
citation	n or other special reason (as specified) ant referring to an oral disclosure, use, exhibition or	cannot be considered to Involve an im- document is combined with one or mo	rentive step when the
other r		ments, such combination being obvious in the art.	
later th	nan the priority date claimed	"&" document member of the same patent	
Date of the	actual completion of theinternational search	Date of mailing of the international sear	rch report
18	8 December 1997	14/01/1998	
Name and n	nailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Van Rohaman C	
	Fax: (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, C	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Junel Application No PCT/EP 97/04396

	PCT/EP 97	7 0 1 3 2 0		
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.		
C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 94, no. 17, 1997, BETHESDA MD USA, pages 9481-9486, XP002050738 see page 9481, column 1, line 1 - column 2, line 19		1-13		
·				
	C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 94, no. 17, 1997, BETHESDA MD USA, pages 9481-9486, XP002050738 see page 9481, column 1, line 1 - column	C.R. JIMÉNEZ ET AL.: "Pattern changes of pituitary peptides in rat after salt-loading as detected by means of direct, semiquantitative mass spectrometric profiling."  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 94, no. 17, 1997, BETHESDA MD USA, pages 9481-9486, XP002050738 see page 9481, column 1, line 1 - column 2, line 19		

,